



**República Federativa do Brasil**  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0517713-8 B1**

**(22) Data do Depósito:** 29/11/2005

**(45) Data de Concessão:** 29/03/2016

**(RPI 2360)**



---

**(54) Título:** INOCULANTE MICORRÍZICO LÍQUIDO

**(51) Int.Cl.:** C05F 11/08; A01N 65/00; C12N 1/14

**(30) Prioridade Unionista:** 08/12/2004 CU 2004-0277

**(73) Titular(es):** INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS (INCA)

**(72) Inventor(es):** FÉLIX FERNÁNDEZ MARTÍN, JOSÉ MIGUEL DELL'AMICO RODRÍGUEZ,  
YUNIESKY PÉREZ CABRERA

## “INOCULANTE MICORRÍZICO LÍQUIDO”

A presente solução técnica se relaciona com as ciências agrícolas, em particular com produção de biofertilizantes orgânicos, e mais especificamente, com a obtenção de um inoculante micorrízico líquido que  
5 pode ser aplicado ao solo e às plantas tanto diretamente como através dos sistemas de irrigação.

Às associações micorrízicas têm sido atribuídas múltiplas funções entre as quais se destacam o melhoramento da superfície absorvente do sistema radicular através de um aumento notável do mesmo, incremento da  
10 tolerância às toxinas do solo, solubilização de certos elementos nutritivos (N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu, Zn, B, etc.), resistência a condições adversas tais como: seca, salinidade, etc., seletividade na absorção, melhoramento das propriedades físicas dos solos a partir da formação de agregados estáveis e certa proteção contra os patógenos radicais. A aplicação desta associação à  
15 agricultura implica um forte impacto ambiental, visto que propicia um melhor equilíbrio entre as diferentes populações de microorganismos presentes na micorrizosfera e rizosfera da associação fungo micorrízico-planta e em geral uma maior proteção contra os efeitos dos estresses bióticos e abióticos.

Estado da Técnica. A obtenção e posterior aplicação de  
20 inoculantes baseados em fungos formadores de micorrizas arbusculares nas plantas têm características peculiares, devido a que estes não crescem em meios sintéticos artificialmente, e sim completam seu ciclo de vida nas raízes de uma planta hospedeira, de modo que uma vez finalizado o ciclo de vida vegetal (para a produção destes inoculantes utiliza-se geralmente plantas de  
25 ciclo curto com 3 a 4 meses de vida), extrai-se o sistema radical colonizado pelo fungo, assim como os propágulos fúngicos (micélio extramátrico e esporos) desenvolvidos durante a associação, assim como o substrato onde se desenvolveram, constituindo então todos estes componentes um inoculante micorrízico em base sólida (Fernández, F. Capítulo 3. Bases Científico

Técnicas para el de los sistemas micorrizados eficientemente. En: Rivera, Fernández, eds. INCA, A Havana. 2003.)

Na produção atual deste tipo de inoculante, utiliza-se os seguintes substratos (Feldmann, F. and Idczak, E. Inoculum production of Vesicular -arbuscular Mycorrhizal Fungi for use in tropical nurseries. In: Methods in Microbiology, Volume 24 ISBN 0-12- 521524-x. Eds. Academic Press Limited. 1992; Fernández, F et al., Certificado de Autor 22641. OCPI. 1999):

- Solo
- 10 - Solo + Matéria Orgânica.
- Matéria Orgânica
- Areia
- Argilas - Argilas + Areia
- Argilas + Matéria Orgânica
- 15 - Areia + Matéria Orgânica + Solo.
- Solução Nutritiva em câmara de fluxo líquido.
- Vermiculita - Perlita
- Musgo de turfa.
- Argila montmorillonita expandida.
- 20 - Combinações de todas estas.

Os produtos micorrízicos desenvolvidos a partir dos substratos acima mencionados se aplicam diretamente recobrando a semente com 10% em relação ao peso total da semente a semear diretamente no campo (Fernández, F et al., Certificado de Autor 22641. OCPI. 1999) ou a aplicação direta de inoculantes à razão de 1 a 2 T. h<sup>-1</sup>. No caso dos cultivos de sementeiros e viveiros, a dose de aplicação não deve exceder de 1 kg. m<sup>2</sup>, e de 10 g/semente, colocando o produto sempre por baixo da semente a semear respectivamente (Sieverding, E. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft fur techniische Zusammenarbeit (GTZ)

GMBH, Federal Republic of Germany.1991. 371 p).

A aplicação destes inoculantes nos sistemas de irrigação ou ferti-irrigação é devida fundamentalmente à ausência de um inoculante líquido que reúna as características adequadas que lhe permitam suportar as bruscas alterações da pressão hidrostática que se gera nos condutos de irrigação, o que impossibilitou sua aplicação por esta via.

A produção de inoculantes micorrízicos arbusculares foi desenvolvida com base na aplicação em substratos sólidos, semi-sólidos a floculantes e em menor escala na utilização destes microorganismos em meios líquidos.

Quanto aos meios sólidos, existem exemplos de patentes que utilizaram diversos substratos de multiplicação como são os casos de: US4945059, JP7123979, JP4187081, DE10161443, DE10221762. Estes inoculantes têm os inconvenientes de que por em são manipulados volumes grandes de substrato, a capacidade germinativa dos esporos está afetada por largos períodos de dormência, a concentração de propágulos neste produto é natural, ou seja não se pode concentrar com a magnitude desejada.

No caso dos inoculantes semi-sólidos foram publicadas as seguintes patentes: EP0726305, EP0596217, EP0072213, US5120344, EP0495108, EP0475433, US5436218, US3437625, US3557562, EP0023347, US2856380, US3857991, GB2381264. Estes produtos se baseiam na utilização de substratos como géis, copolímeros, argilas, em meios floculantes. Igualmente ao caso anterior, manipula-se volumes importantes na aplicação agrícola e tampouco se consegue superar os períodos de dormência nos esporos dos fungos micorrízicos.

Os inoculantes líquidos reportados na informação de patentes, estão basicamente relacionados com as ectomicorrizas (CN1420167, US2004208852) e só se encontrou um meio líquido reportado pelos japoneses (JP4141023), baseado no uso de um estabilizante (ácido cítrico ou sua forma

de sal) para proteger esporos.

Em geral os produtos micorrízicos conhecidos não têm uma germinação de esporos uniforme, não pode ainda superar os mecanismos de dormência destas espécies fúngicas, pois os substratos em que estão  
5 apresentados estes inoculantes não conferem aos propágulos situações estressantes que acelerem os processos de germinação dos esporos uma vez inoculados os mesmos em condições de campo

Por outra parte, os inoculantes micorrízicos fabricados até o momento têm um limite natural de propágulos micorrízicos, não foram  
10 reportados e isto se deve a que o procedimento de obtenção não leva a concentração de maior quantidade de propágulos específicos. O produto micorrízico conhecido com maior concentração na atualidade tem uma relação de esporos: micélio de 50 esporos. g.<sup>-1</sup> substrato: 65 mg. micélio<sup>-1</sup>. substrato. (Fernández, F. Capítulo 3. Bases Científico Técnicas para el manejo  
15 de los sistemas micorrizados eficientemente. En: Rivera, Fernández, eds. INCA, Havana. 2003.)

A glicoproteína específica destes fungos, chamada Glomalina, acelera os processos de formação de micro agregados estáveis no solo, melhorando assim sua estrutura física, incrementando os níveis de oxigênio, e  
20 facilitando uma melhor colonização do organismo. Como a Glomalina só se excreta de maneira natural durante o funcionamento da simbiose, ou sob a ação de um determinado meio de excreção, a mesma não aparece excretada no suporte sólido nos inoculantes micorrízicos conhecidos, e os níveis em que ela é encontrada no solo dependem do estado da simbiose com o organismo, e  
25 não podem elevar-se mais além do que dita simbiose permite.

Descrição detalhada da invenção..

O objetivo principal desta invenção, consiste na obtenção de um produto líquido que propicie um massivo manejo dos fungos micorrízicos, com maior qualidade e eficiência, para que possa ser empregado diretamente

em sistemas de irrigação localizada, em doses adequadas e rentáveis.

Para a obtenção de dito inoculante desenvolve-se os seguintes passos:

1. Semeadura de plantas hospedeiras *Braquiaria decumbens*,  
5 *Sorghum vulgare* ou outra espécie micótrofa obrigatória e estas se desenvolvem sobre um substrato de reprodução: solo, argilas caulínica ou motmorillonítica, perlita, zepeolita, vermiculita e matéria orgânica (aplicada de acordo com as necessidades da simbiose).
2. Estas plantas são inoculadas diretamente colocando por  
10 baixo das sementes, 10 gramas de cepa pura de fungos micorrízicos, para sua produção utilizou-se as seguintes espécies de forma individual: *Glomus fasciculatum*, *Glomus clarum*, *Glomus spurcum*, *Glomus mosseae*, *Glomus intrarradices*, *Gigaspora margarita*, e outras espécies de Glomales e Diversisporales, porém podem ser empregadas outras espécies de fungos  
15 micorrízicos.
3. Ao término do ciclo de vida da planta, elimina-se a parte aérea, e obtém-se um substrato sólido que consiste em uma mistura de propágulos micorrízicos (radículas colonizadas, micélio fúngico e esporos de resistência) e o suporte inicial.
- 20 4. Posteriormente extrai-se os propágulos micorrízicos pelo método de decantação a úmido e peneiramento através de diversas peneiras que vão desde uma faixa de 400 até 40 µm, de acordo com a espécie de fungo micorrízico em questão, a fração sólida que se recolhe na peneira mais fina, é centrifugada e depois se decanta a fração líquida com os propágulos fúngicos.
- 25 5. Quando se separam todos os componentes micorrízicos, estes são desinfetadas superficialmente com uma solução de Cloramina T (2%) durante 5 minutos, lava-se três vezes com água destilada estéril e coloca-se em Sulfato de Estreptomicina durante 24 horas, uma vez culminado se acondiciona-se em uma mistura aquosa à base de Sorbitol (entre 5 e 10%),

Manitol (2 %), Tween 40, (5%), Tween 80 (2%) , polietileno glicol 4000 podendo-se aplicar entre uma faixa de 100 e 500 mg.l.<sup>-1</sup> e agar desde 0,8 a 0,1%. Neste caso, o produto pode ser fabricado até os limites físicos permissíveis de unidade de propágulos ml<sup>-1</sup>. de meio de cultivo.

5                            6. A solução aquosa com os propágulos ficaria composta pelos seguintes elementos:

a) Componentes ativos:

- Propágulos micorrízicos: Esporos de resistência, micélio extramático arbuscular, Glomalina e radículas menores de 40 um,  
10 colonizadas com o fungo em questão.

b) Outros Componentes:

- Sorbitol, em uma faixa entre 5 e 10%,
- Manitol, em uma faixa entre 2 e 5%,
- Tween 40, em uma faixa entre 5 e 7%,
- 15 • Tween 80 em uma faixa entre 2 e 7% ,
- polietileno glicol aplicado numa faixa de 100 a 500 mg.l.<sup>-1</sup>
- Agar, em uma faixa entre 0,8 e 0,1%.

Uma vez concluídos estes procedimentos, fica pronto um produto para ser aplicado em campo ou nos sistemas de irrigação localizada,  
20 garantindo que os propágulos micorrízicos, e em especial os esporos, fiquem protegidos dos efeitos da pressão osmótica superficial e que uma vez aplicados em água, estes são capazes de romper os mecanismos de dormência dos esporos e alcancem uma forte capacidade colonizadora, desenvolvendo uma resposta positiva nos cultivos.

25                            A invenção proposta consiste em um inoculante que por sua forma de fabricação, pode ser altamente infectivo, porque pode-se alcançar concentrações muito elevadas, sem mais limitações que os limites físicos que permitem esta dissolução aquosa, ou as conveniências para sua aplicação, podendo obter-se concentrações da ordem de 1 ou 2 milhões de esporos .l<sup>-1</sup> e

de 1 e 2 gramas de micélio .L<sup>-1</sup>.

Ademais, pelo fato de os propágulos micorrízicos se encontrarem em um meio aquoso, estimula-se a secreção da Glomalina, que se encontra presente em altas concentrações na composição deste inoculante, conferindo-lhe características especiais, acelerando assim, com sua aplicação direta, os processos de formação de microagregados estáveis no solo, melhorando imediatamente a estrutura física do mesmo, e incrementando os níveis de oxigênio, o que facilita uma melhor colonização deste microorganismo, garantindo um desenvolvimento muito mais eficiente da simbiose micorrízica.

Este inoculante que é proposto na presente invenção promove a aplicação direta do produto em campo, diminuindo seu volume, ao aumentar sua concentração, facilitando desta forma seu manejo e transporte, e eliminando mão de obra.

Ele está montado em um suporte líquido concentrado, com uma viabilidade de 8 meses, que pode ser totalmente aplicado através dos sistemas de ferti-irrigação, conseguindo-se uma distribuição homogênea, comprovada por experimentos em distintas escalas. Este fato garantiu uma bem sucedida inoculação em todas as plantas sob o sistema de irrigação, o que se traduz em um incremento significativo nos rendimentos (ver informe técnico).

#### Referências:

- Dell Amico. et al, Journal of Agricultural Science.. 2002
- Feldmann, F and Idczak, E. Inoculum production of Vesicular -arbuscular Mycorrhizal Fungi for use in tropical nurseries. In: Methods in Microbiology. Volume 24 ISBN 0-12-521524-x. Eds. Academic Press Limited. 1992
- Fernández, F. Capítulo 3. Bases Científico Técnicas para el manejo de los sistemas micorrizados eficientemente. En: Rivera, Fernández, eds. INCA, A Habana. 2003.
- Fernández, F et al., Patente 22641. OCPI. 1999

- Sieverding, E. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 1991. 371 p.

## REIVINDICAÇÕES

1. Inoculante micorrízico líquido caracterizado pelo fato de que tem a seguinte composição:

5 a. propágulos micorrízicos compostos por esporos de resistência, micélio extramátrico arbuscular, Glomalina e radículas menores de 40  $\mu\text{m}$ , colonizadas com o fungo em questão.

b. sorbitol em uma faixa entre 5 e 10%

c. manitol em uma faixa entre 2 e o 5%.

10 d. monopalmitato de sorbitano polioxietileno (20) em uma faixa entre 5 e 7%

e. monooleato de sorbitano polioxietileno (20) em uma faixa entre 2 e 7%.

f. polietileno glicol aplicado entre uma faixa de 100 e 500  $\text{mg.l}^{-1}$

15 g. agar a 0,1%.

2. Inoculante micorrízico líquido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ele pode ser aplicado em água através dos sistemas de irrigação e ferti-irrigação.

20 3. Inoculante micorrízico líquido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que permite um nível de concentração da ordem de 1 ou 2 milhões de esporos. $\text{l}^{-1}$  e de 1 e 2 gramas de micélio. $\text{l}^{-1}$ .

25 4. Inoculante micorrízico líquido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que se pode utilizar o polietileno glicol de diversos pesos moleculares, entre uma faixa de 4000 e 10000 com uma concentração em dissolução conforme o peso molecular em uma faixa entre 100 e 500  $\text{mg.l}^{-1}$ .

RESUMO

## “INOCULANTE MICORRÍZICO LÍQUIDO”

A solução técnica proposta se relaciona com o ramo da agricultura, a biotecnologia do solo e especificamente com a produção e aplicação dos fungos micorrízicos arbusculares, microorganismo que melhora a eficiência na captação de nutrientes pelas plantas, nível hídrico, produção vegetal, proteção contra alguma das doenças da raiz, etc. Ele consiste em um produto líquido para a aplicação dos fungos micorrízicos arbusculares, partindo da utilização de um meio aquoso que permite obter uma estabilização dos propágulos micorrízicos que possibilita a formação de agregados de solos e uma viabilidade comprovada em meio líquido entre 12 e 18 meses que se pode utilizar nos sistemas de irrigação e ferti-irrigação, aplicando-se de forma direta em campos ou estufas de cultivo protegido, além de permitir a superação dos mecanismos de dormência dos esporos e obter um elevado nível de concentração que permite e facilita seu manejo e transporte. Com a aplicação deste produto, pode-se manejar os fungos micorrízicos em cultivos sob sistemas de irrigação em grande escala, com uma melhoria produtiva e ambiental.